Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither)

EINFLUSS VON CHLOROQUIN AUF DIE PHYTOHÄMAGGLUTININDUZIERTE LYMPHOZYTENTRANSFORMATION (LTT)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Herbert Loosen

Düsseldorf 1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0054

Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither)

EINFLUSS VON CHLOROQUIN AUF DIE PHYTOHÄMAGGLUTININDUZIERTE LYMPHOZYTENTRANSFORMATION (LTT)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Herbert Loosen

Düsseldorf 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. med. H.-L. KRÜSKEMPER

Referent: Prof. Dr. med. G. GOERZ

Correferent: Prof. Dr. med. dent. F. SCHÜBEL

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Chloroquin als Medikament zur Therapie immunologischer Erkrankungen	1
1.2.	LTT als Methode zur Beurteilung der zellvermittelten Immunität	1
2.	MATERIAL UND METHODE	3
2.1.	Probanden	3
2.2.	Lymphozytentransformationstest	4
2.2.1.	Geräte	4
2.2.2.	Reagenzien	5
2.2.3.	Reinigung der Geräte	6
2.2.4.	Gewinnung der Lymphozyten	7
2.2.5.	Ansatz der Lymphozytenkulturen	8
2.2.6.	Messung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus in die DNS	11
3.	ERGEBNISSE	13
3.1.	PHA-Stimulation	13
3.2.	Gleichzeitige PHA- und Chloroquin-Applikation	13
3.2.1.	Chloroquin-Konzentration: 100 mg/100 ml	13
3.2.2.	Chloroquin-Konzentration: 10 mg/100 ml	14
3.2.3.	Chloroquin-Konzentration: 1 mg/100 ml	14
3.2.4.	Chloroquin-Konzentration: 0,1 mg/100 ml	14

Seite

3.3. Beeinflussung der PHA-Stimulation bei späterer Chloroquin-Applikation 15

3.3.1. Chloroquin zwei Stunden nach PHA 15
3.3.2. Chloroquin vier Stunden nach PHA 15
3.3.3. Chloroquin sechs Stunden nach PHA ... 15
3.3.4. Chloroquin neun Stunden nach PHA 16
3.3.5. Chloroquin zwölf Stunden nach PHA ... 16

3.4. Beeinflussung der PHA-Stimulation bei vorheriger Chloroquin-Applikation ... 16

3.5. Synopsis 17

Darstellung der Ergebnisse (Tabelle 1 - 10) 18

4. DISKUSSION 28

4.1. Einfluß auf die Lysosomen 28

4.2. Einfluß des Chloroquin auf die Antikörper-Bildung und die Antigen-Antikörperreaktion 30

4.3. Beeinflussung zellulärer Immunphänomene 34

4.4. Einfluß von Chloroquin auf Nukleinsäuren und Chromosomen 37

4.5. Weitere Befunde 39

4.6. Diskussion der eigenen Befunde 40

5. ZUSAMMENFASSUNG 46

6. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN 48

7. LITERATURVERZEICHNIS 49

1. EINLEITUNG

1.1. Chloroquin als Medikament zur Therapie immunologi- Erkrankungen

Chloroquin wird weltweit seit Jahrzehnten als Antimalariamittel verwendet. Für den Dermatologen von besonderem Interesse ist seine Wirksamkeit bei verschiedenen Erkrankungen wie zahlreichen Lichtdermatosen (z.B. polymorphen Lichtdermatosen) oder der Porphyria cutanea tarda, in erster Linie gilt es jedoch als Standardtherapeutikum bei den verschiedenen Formen des Erythematodes (4). Diese Erkrankung gilt heute als Musterbeispiel für eine Autoaggressionskrankheit. Bei der Pathogenese dieser Krankheiten stehen Lymphozyten im Mittelpunkt. Deshalb erscheint es sinnvoll, den Einfluß des Chloroquins auf die Funktion der Lymphozyten zu untersuchen, um hieraus Schlüsse auf den Wirkungsmechanismus des Medikamentes ziehen zu können.

1.2. Lymphozytentransformationstest (LTT) als Methode zur Beurteilung der zellvermittelten Immunität

Der Lymphozytentransformationstest (LTT) hat sich in letzter Zeit als eine Standardmethode zur Untersuchung der zellvermittelten Immunität herauskri-

stallisiert (24). Der Ausfall der Reaktion gibt in erster Linie eine Auskunft über bestimmte Funktionen der T-Lymphozyten. Beim LTT werden Lymphozyten mit verschiedenen obligaten Mitogenen stimuliert, so beispielsweise dem Lecithin des Phaseolus vulgaris, Phytohämagglutinin (PHA) (23). Dieses stimuliert bevorzugt die T-Lymphozyten (17). Unter Stimulation versteht man zahlreiche Stoffwechselveränderungen der Zelle, die schließlich zur Umwandlung des Lymphozyten in einen aktiven Lymphoblasten führen und in eine Zellteilung münden.

Für die Quantifizierung dieser Lymphozytenstimulation macht man sich die Möglichkeit der Bestimmung der Neusynthese der DNS zunutze. Man mißt flüssigkeitsscintigraphisch den Einbau der markierten Purinbase Thymidin, die ein Baustein der DNS ist, in die Zelle. Es wird der Quotient aus der Einbaurate stimulierter (= mit PHA inkubierter Zellen) zur Einbaurate nicht stimulierter (= mit NaCl behandelter Zellen) gebildet. Dieser Quotient wird Stimulationsindex (SI) genannt, und er gilt als Maß für die Stimulation.

Wir verglichen in unseren Untersuchungen die Stimulationsindices von Lymphozyten, die mit PHA allein inkubiert wurden, mit den Stimulationsindices von Lymphozyten, die außer mit PHA auch mit Chloroquin in unterschiedlichen Konzentrationen exponiert wurden. Außerdem untersuchten wir, ob das zeitliche Intervall zwischen der Zugabe des Mitogens und des Chloroquins einen Einfluß auf die Einbaurate markierten Thymidins hat.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Probanden

Insgesamt wurden 26 Personen untersucht, und zwar 10 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 33 Jahren und 16 Männer mit einem Durchschnittsalter von 36 Jahren.

Das Probandenkollektiv setzte sich zusammen aus Studenten, Kliniksangehörigen und Patienten der Hautklinik der Universität Düsseldorf. Ausgeschlossen wurden Patienten mit malignen Tumoren, Arzneimittelüberempfindlichkeiten, hämatologischen Systemerkrankungen sowie anderen Krankheitsbildern, bei denen eine veränderte in vitro-Stimulierbarkeit der Lymphozyten nicht auszuschließen ist. Ausgeschlossen waren ferner Patienten, die bis zu zwei Wochen vor der Blutentnahme für den Lymphozytentransformationstest Medikamente eingenommen hatten oder mit glucocorticoidhaltigen Externa behandelt worden waren; ebenso Patienten, die bis zu zwei Wochen vor dem Versuch Infusionen von Vollblut, Plasma oder Serum erhalten hatten oder Resochin- bzw. Vitamin A-haltige Medikamente oder Antibiotika eingenommen hatten.

2.2. Lymphozytentransformationstest (LTT)

2.2.1. Geräte

Einmalblutentnahmekanülen
Fa. Braun, Melsungen

20 ml Rekordspritzen aus Polypropylen
Fa. Pharma-Plast, Braunschweig

Röhrchen aus Jenaer Glas
Fa. Schott, Mainz

Kapsenberg-Kappen

Brutschrank
Fa. Memmert

Doppelwandiges, temperierbares Glassystem nach Entwurf des Allergielabors der Hautklinik der Universität Düsseldorf
Fa. Bayer, Düsseldorf

Wasserbad Exa-Therm U3 electronic
Fa. Juluba

Zählkammer Thoma
Fa. Brand

Röhrchen aus Polypropylen 1,7 x 10,0 cm
Fa. Greiner, München

Millex-Filter (Porengröße 0,22 µm)
Fa. Millipore, Bedford/Mass. - USA

Reaktionsgefäße für Mikrolitersysteme
Fa. Saarstedt

Zentrifuge für Mikrolitersystem, Nr. 3200
Fa. Eppendorf, Hamburg

Handrührstab für Mikrolitersystem, Nr. 3351
Fa. Eppendorf, Hamburg

Thermostat für Mikrolitersystem, Nr. 3401
Fa. Eppendorf, Hamburg

Glaskugeln, 1 cm
Fa. Bayer, Düsseldorf

Polypropylen-Röhrchen zur Flüssigkeitsscintillationszählung, 15 ml, mit Schraubverschluß
Fa. Packard, Frankfurt/Main

Flüssigkeitsscintillationszähler Tri-Carb-Spektrometer, Serie 3380
Fa. Packard, Frankfurt/Main

2.2.2. Reagenzien

Heparin Vitrum^{R}, 10.000 IE
Deutsche Kabi GmbH, München

NaCl-Lösung 0,9 %ig

Phytohämagglutinin P
Fa. Burroughs Welcome

Medium TC 199
Fa. Difco, Detroit/Mich. - USA

Methyl-^{3}H-Thymidin
(spez. Aktivität 5 Ci/mMol)
The Radiochemical Center, Amersham
Fa. Buchter, Braunschweig

Perchlorsäure 4 %ig
Fa. Merck, Darmstadt

Perchlorsäure 70 %ig
Fa. Merck, Darmstadt

Äthanol abs. (99,8 %) p.a.
Fa. Merck, Darmstadt

Trichloressigsäure 5 %ig

Scintillationsflüssigkeit Insta-Gel^{R}
Fa. Packard, Frankfurt/Main

Resochin^{R} unterschiedlicher Konzentration
Fa. Bayer, Leverkusen

2.2.3. Reinigung der Geräte

Auf absolute Sauberkeit und Einhaltung von möglichst sterilen Versuchsbedingungen als notwendige Voraussetzung für optimale Zell- und Gewebekulturen wurde geachtet. Die Reinigung der verwendeten Glaswaren erfolgte zunächst mechanisch. Danach Spülen der Geräte in einem Eiweiß und Blutreste lösenden Spülmittel in entmineralisiertem Wasser und einige Male mit Aqua dest. und Aqua bidest.. Nach Trocknung im Trockenschrank erfolgte die Sterilisation im Heißluftsterilisator 90 Minuten lang bei 180^{o}C. Die Geräte wurden in sterilen Tüchern verpackt aufbewahrt. Beim Ansetzen der Kulturen diente ein steriles Einmaltuch als Unterlage. Die Reaktionsgefäße wurden nach dem Öffnen und vor dem Verschließen mit dem Bunsenbrenner abgeflammt. UV-Lampen, die bei Nacht eingeschaltet wurden, dienten der Reduktion der Luftkeimzahl.

2.2.4. Gewinnung der Lymphozyten

Die für die Kultivierung benötigten Lymphozyten entstammten in allen Fällen dem peripheren Venenblut. Unter streng aseptischen Kautelen wurde nach vorheriger Reinigung der Ellenbeugenhaut mit 70 %igem Äthylalkohol mit Hilfe von Einmalblutentnahmekanülen und 20 ml Einmalspritzen (Fa. Braun, Melsungen) 20 - 80 ml Blut unter Vermeidung von Schaumbildung entnommen und sofort bei der Abnahme mit dem in der Spritze befindlichen Heparin (400 IE/10 ml Blut) vermischt. Anschließend wurde das heparinisierte Blut in sterile Kapsenberg-Röhrchen gefüllt und diese mit sterilen Kappen verschlossen. Zur Sedimentation der Erythrozyten wurden die Röhrchen 45° schräg stehend bei 37°C 90 Minuten im Brutschrank aufbewahrt. Der leukozytenreiche Plasmaüberstand wurde bis zur Erythrozytengrenze mit Hilfe der Pasteurpipette und des Peleusballes vorsichtig abpipettiert und unter Vermeidung von Schaumbildung durch wiederholtes Aufziehen mit der Pipette in einem Reagenzglas durchmischt.

Zur Gewinnung möglichst reiner Lymphozytensuspensionen wurde in Anlehnung an die von LAMVIK (15) angegebene Methode verfahren, bei der phagozytierende Zellen (Monozyten und Granulozyten) von nicht phagozytierenden Lymphozyten getrennt werden. Die leukozytenreiche Plasmasuspension wurde über eine zur Hälfte mit Watte gestopfte, auf 37°C temperierte Säule (1,5 cm Durchmesser, 25 cm Länge) geschickt.

Diese mit Watte gestopfte Säule war vorher sterilisiert und mit dem Medium TC 199 benetzt worden. Während des Durchlaufs der Plasmasuspension wurde die Säule von 37°C warmem Wasser umspült. Die phagozytierenden Zellen bleiben dabei an der Wattesäule hängen, Lymphozyten hingegen passieren die Säule. Dadurch wurden Zellsuspensionen gewonnen, die zu über 90 % aus Lymphozyten bestanden, jedoch auch einige Makrophagen und Granulozyten enthielten. Die Ausbeute betrug bei diesem Verfahren 97 - 99 % der Lymphozyten. In der Thoma-Zählkammer wurde die Zellzahl der Plasmasuspension bestimmt.

Durch Verdünnung mit dem Kulturmedium TC 199 wurde auf eine für unsere Versuchsbedingungen besonders geeignete Zellzahl von etwa 2×10^6 Lymphozyten pro ml eingestellt.

2.2.5. Ansatz der Lymphozytenkulturen

Als Kulturgefäße dienten sterile, einzeln verpackte, mit einer Spezialkappe verschließbare, 15,5 ml fassende Röhrchen aus Polypropylen (Greiner, Düsseldorf - Größe 17/100).

Die Züchtung der Lymphozyten erfolgte im Brutschrank bei 37°C unter einem Neigungswinkel der Röhrchen von 45°.

Jeder Ansatz bestand aus zwei Kontrollkulturen und mehreren Testkulturen. Alle Kulturen wurden dreifach angesetzt. Jedes Röhrchen enthielt 0,4 ml Lymphozytensuspension. Positive und negative Kontrollansätze enthielten 0,59 ml Kulturmedium TC 199 (Difco), die Testkulturen 0,58 ml.

Den negativen Kontrollkulturen wurden zusätzlich zum Nachweis der spontanen Transformationsrate 0,01 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung zugesetzt.
Die positiven Kontrollkulturen enthielten zusätzlich 0,01 ml Phytohämagglutinin P.

Die eigentlichen Versuchsansätze bestanden in Kulturen, denen außer PHA Chloroquin (Resochin, Bayer) in unterschiedlicher Dosierung zugegeben wurde, und zwar je 0,01 ml.
Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

100	mg/100 ml	=	3,135 M
10	mg/100 ml	=	0,313 M
1	mg/100 ml	=	0,031 M
0,1	mg/100 ml	=	0,003 M

PHA und Chloroquin wurden in unterschiedlicher Weise den Lymphozytenkulturen zugegeben.
Folgende Ansätze wurden durchgeführt:

1. PHA und Resochin wurden gleichzeitig den Kulturen zugegeben.
2. Zunächst wurde PHA zugegeben, die Kulturen inkubiert, und 2, 4, 6, 9 oder 12 Stunden später erfolgte der Resochin-Zusatz.
3. Die Kulturen wurden zunächst mit Resochin-Zusatz angesetzt, und 2, 4 bzw. 6 Stunden später erfolgte die PHA-Zugabe.

Das folgende Beispiel zeigt den Lymphozytenkulturansatz, wie er in allen Versuchen angewendet wurde.

Kulturansätze	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Testkulturen
Kulturmedium TC 199 (Difco)	0,59 ml	0,59 ml	0,58 ml
Lymphozytensuspension (90 %ig) 2×10^6 Zellen/ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
NaCl 0,9 %ig	0,01 ml	-	-
Phytohämagglutinin P	-	0,01 ml	0,01 ml
Resochin (Bayer) verschiedene Konzentrationen	-	-	0,01 ml

Der pH-Wert lag beim Ansetzen der Kulturen bei etwa 7,5 und sank je nach Wachstum und Stoffwechselaktivität der Zellen bis etwa 7,0 ab. Damit bewegte er sich innerhalb des für die Lymphozytenkultivierung optimalen Bereichs von pH 6,9 bis 7,7.

2.2.6. Messung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus in die DNS

Die Kulturdauer betrug 72 Stunden. Vier Stunden vor der Beendigung der Kultur wurden jedem Ansatz 0,1 ml ^{3}H-Thymidin = 5 µl Methyl-^{3}H-Thymidin mit einer Mikroliterpipette zugesetzt.

Nach vierstündiger Inkubation mit Methyl-^{3}H-Thymidin wurde die Kulturflüssigkeit durch Schütteln resuspendiert und in 1 ml fassende Reaktionsgefäße umgeschüttet. Der Abbruch der Kultur erfolgte durch Fällung des Proteins mit 60 µl 70 %iger Perchlorsäure.

Nach gründlichem Durchmischen des Präzipitats mit einem elektrischen Rührstab wurde 30 Sekunden bei 1.700 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zweimal mit je 1 ml 4 %iger Perchlorsäure und anschließend fünfmal mit je 1 ml 96 %igem Äthylalkohol gewaschen. Dabei wurde der Ansatz jeweils mit dem elektrischen Rührstab resuspendiert und anschließend wieder bei 1.700 U/min. zentrifugiert. Das so gereinigte Sediment wurde dann mit 400 µl Trichloressigsäure versetzt, mit dem elektrischen Rührstab durchmischt und 15 Minuten in einem Thermostaten bei 90°C hitzedenaturiert. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde 2 Minuten bei 1.700 U/min. zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden in Plastikfläschchen mit Schraubverschluß gegeben, die 10 ml Scintillationsflüssigkeit enthielten und gekühlt. Zur quanti-

tativen Auswertung der Einbaurate von ^{3}H-Thymidin in die neusynthetisierte DNS (VLASZIN u. Mitarb. (33)) wurde die Radioaktivität mit dem Flüssigkeits-scintillationszähler gemessen. Dazu wurde jede Probe 10 Minuten in den Flüssigkeitsscintillationszähler gebracht und die erhaltenen "counts per minute" (cpm) registriert. Als Stimulationsindex (SI) wurde der Quotient

$$SI = \frac{\text{cpm/}10^6 \text{ Lymphozyten in Kultur mit Resochin/PHA oder PHA}}{\text{cpm/}10^6 \text{ Lymphozyten in Kultur mit NaCl}}$$

verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. PHA-Stimulation

Die Stimulationsindices durch PHA bei der Kontrollgruppe aus acht Probanden betrug 28,8 - 61,1, was gut mit den Befunden der Literatur für die hier verwendete Methode übereinstimmt.

3.2. Gleichzeitige PHA- und Chloroquin-Applikation

Jeweils acht Kulturen verschiedener Probanden wurde Chloroquin in unterschiedlicher Konzentration zugegeben.

3.2.1. Chloroquin-Konzentration 100 mg/100 ml (= 3,135 M)

Bei Verwendung der höchsten Chloroquin-Konzentration kommt es zu einer toxischen Schädigung der Zellen. Dies schlägt sich in einer signifikanten Senkung der SI im Vergleich zu den PHA-Kontrollen nieder. Dies gilt ohne Einschränkung für alle untersuchten Probanden. Die Senkung der SI durch Chloroquin (100 mg/100 ml (= 3,135 M)) ist hochsignifikant ($p < 0,01$).

3.2.2. Chloroquin-Konzentration 10 mg/100 ml (= 0,313 M)

Zwischen den einzelnen Probanden finden sich keine signifikanten Unterschiede. Allerdings ist die Reaktion nicht einheitlich, da bei einigen Probanden eine Senkung, bei anderen eine Steigerung der SI nachweisbar war.

3.2.3. Chloroquin-Konzentration 1 mg/100 ml (= 0.031 M)

Die Stimulationsindices bei dieser Konzentration zeigen durchweg eine leichte Erhöhung im Vergleich zur PHA-Stimulation. Die Unterschiede sind nicht statistisch signifikant.

3.2.4. Chloroquin-Konzentration 0,1 mg/100 ml (= 0,003 M)

Bei dieser Konzentration findet sich eine ausgeprägte Erhöhung gegenüber der PHA-Stimulation. Auch hier ist die Signifikanz aufgrund großer Streuung der Werte nicht erreicht.

3.3. Beeinflussung der PHA-Stimulation bei nachfolgender Chloroquin-Applikation

3.3.1. Chloroquin zwei Stunden nach PHA (s. Tabelle 2)

Die Ergebnisse für alle angewendeten Konzentrationen zeigen keine wesentlichen Unterschiede zu den Befunden, die bei gleichzeitiger PHA- und Chloroquin-Gabe erzielt wurden (s. Tabelle 1).

3.3.2. Chloroquin vier Stunden nach PHA (s. Tabelle 3)

Auch in dieser Versuchsanordnung ergeben sich keine Unterschiede zu der gleichzeitigen PHA- und Chloroquin-Applikation. Es findet sich allerdings bei den Konzentrationen 1,0 und 0,1 mg/100 ml (= 0,031 M bzw. 0,003 M) eine deutliche Steigerung der SI gegenüber den PHA-Kontrollen.

3.3.3. Chloroquin sechs Stunden nach PHA (s. Tabelle 4)

Hierbei ergeben sich keine Unterschiede zu den bisher beschriebenen Ergebnissen. Die höchste Chloroquin-Konzentration (100 mg/100 ml = 3,135 M) senkt den SI hochsignifikant, die Konzentration 10 mg/100 ml (= 0,313 M) deutlich (aber nicht signifikant), wäh-

rend die Konzentrationen 1,C (= 0,031 M) und 0,1 mg/100 ml (= 0.003 M) sich nicht von den PHA-Kontrollen unterscheiden.

3.3.4. Chloroquin neun Stunden nach PHA
(s. Tabelle 5)

Es ergibt sich hier prinzipiell kein Unterschied zu den bisher beschriebenen Befunden, insbesondere zu den Ergebnissen von sechs Stunden (s. 3.3.3. und Tabelle 4).

3.3.5. Chloroquin zwölf Stunden nach PHA
(s. Tabelle 6)

Es gilt das Gleiche wie bei 3.3.4. Gesagte.

3.4. Beeinflussung der PHA-Stimulation bei vorheriger Chloroquin-Applikation
(s. Tabellen 7, 8, 9)

Die Gabe von Chloroquin 2, 4 oder 6 Stunden vor PHA zum Inkubationsansatz hat keine prinzipiellen Unterschiede zur gleichzeitigen PHA/Chloroquin-Gabe zur Folge. Bei den Konzentrationen 1,0 und 0,1 mg/100 ml (= 0,031 M bzw. 0,003 M) ist der SI deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht.

3.5. Synopsis

Da sich durch die zeitliche Verschiebung der Chloroquin-Zugabe vor oder nach PHA-Inkubation keine signifikanten Unterschiede ergaben, ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse berechtigt (s. Tabelle 10). Es ergaben sich bei nunmehr 72 Einzelversuchen statistisch signifikante ($p < 0,05$) bis hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zwischen PHA- und PHA/Chloroquin-behandelten Lymphozyten. Die Zugabe von 100 und 10 mg/100 ml (= 3,135 M und 0,313 M) führte zur Hemmung der PHA-Stimulation, die Chloroquin-Konzentration von 1 mg/100 ml (= 0,031 M) hat keinen Einfluß, während eine Konzentration von 0,1 mg/100 ml (= 0,003 M) die PHA-induzierte Lymphozytentransformation steigert.

PHA/Chloroquin 100 mg/100 ml:
SI $1,3 \pm 2,9$ ($p < 0,01$)

PHA/Chloroquin 10 mg/100 ml:
SI $20,8 \pm 16,7$ ($p < 0,01$)

PHA/Chloroquin 1 mg/100 ml:
SI $44,0 \pm 34,2$ ($p > 0,05$, nicht signifikant)

PHA/Chloroquin 0,1 mg/100 ml:
SI $49,5 \pm 34,3$ ($p < 0,05$)

PHA allein: SI $37,5 \pm 27,4$

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 - 10 zusammengefaßt.

Tabelle 1:
Stimulationsindices von Lymphozyten, die gleichzeitig mit PHA und Chloroquin inkubiert wurden. Inkubationszeit 72 Stunden.

Versuchsperson	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
1	102,4	0,7	2,1	90,8	44,4
2	27,0	0,5	15,0	39,3	39,9
3	14,9	5,4	20,8	33,3	36,9
4	18,9	3,5	12,6	22,8	28,7
5	24,6	4,4	31,3	40,5	49,8
6	9,0	5,7	38,3	36,9	92,2
7	36,9	6,3	32,3	20,5	26,4
8	20,1	0,9	26,6	32,1	47,4
$\bar{x}$	31,7	3,4	22,4	39,5	45,7
s	29,7	2,4	12,0	21,9	20,6

* Konzentration in M s. S. 9

Tabelle 2:
Stimulationsindices von Lymphozyten. Inkubation mit PHA, nach zwei Stunden Zugabe von Chloroquin. Gesamtinkubationszeit 72 Stunden.

Versuchs-person	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
1	29,9	0,8	11,0	16,7	23,4
2	22,3	1,0	8,2	28,1	18,7
3	52,0	0,9	37,6	35,6	48,8
4	14,2	0,6	11,0	25,4	34,1
5	30,8	0,8	36,9	55,0	55,7
6	19,5	1,0	13,6	22,7	25,2
7	26,6	0,8	15,4	44,1	49,1
8	55,0	0,8	1,0	28,8	25,6
$\bar{x}$	28,8	0,8	16,8	32,1	35,1
s	17,9	0,1	13,3	12,4	14,2

* Konzentration in M s. S. 9

Tabelle 3:
Stimulationsindices von Lymphozyten. Inkubation mit PHA, nach vier Stunden Zugabe von Chloroquin. Gesamtinkubationszeit 72 Stunden.

Versuchs-person	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
1	32,7	0,8	15,3	47,8	39,7
2	53,0	1,0	25,5	51,1	54,6
3	41,9	0,8	54,1	51,2	45,6
4	30,8	0,6	42,4	87,9	52,3
5	14,2	0,4	7,7	39,9	33,7
6	55,0	0,6	2,0	45,1	60,9
7	44,0	0,4	47,5	74,6	115,4
8	29,9	0,5	7,5	28,6	29,4
$\bar{x}$	37,7	0,6	25,2	53,3	54,0
s	13,5	0,2	20,3	19,1	27,0

* Konzentration in M s. S. 9

Tabelle 4:
Stimulationsindices von Lymphozyten. Inkubation mit PHA, nach sechs Stunden Zugabe von Chloroquin. Gesamtinkubationszeit 72 Stunden.

Versuchs-person	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
1	34,4	1,9	19,0	37,2	42,7
2	72,3	0,8	42,3	90,5	83,7
3	15,8	0,5	6,5	25,4	37,7
4	51,0	0,7	37,7	36,3	32,7
5	33,9	0,8	21,2	32,2	38,4
6	31,5	1,0	27,5	29,8	15,2
7	10,2	0,4	15,7	20,3	23,2
8	19,5	0,5	17,8	21,1	24,1
$\bar{x}$	33,6	0,7	23,5	36,6	37,2
s	20,2	0,5	11,8	22,7	20,9

* Konzentration in M s. S. 9

Tabelle 5:
Stimulationsindices von Lymphozyten. Inkubation mit PHA, nach neun Stunden Zugabe von Chloroquin. Gesamtinkubationszeit 72 Stunden.

Versuchs-person	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
1	10,2	0,4	11,9	14,1	7,4
2	30,8	1,0	54,0	50,0	88,1
3	14,2	0,2	14,3	37,0	30,6
4	26,6	0,7	7,4	19,5	20,0
5	55,0	0,6	7,1	34,7	52,7
6	19,5	0,5	4,8	18,2	15,2
7	29,9	0,3	13,0	18,5	20,9
8	44,0	0,6	34,2	78,8	43,1
$\bar{x}$	28,8	0,5	18,3	33,8	34,8
s	15,0	0,3	17,1	21,9	26,2

* Konzentration in M s. S. 9

Tabelle 6:
Stimulationsindices von Lymphozyten. Inkubation mit PHA, nach zwölf Stunden Zugabe von Chloroquin. Gesamtinkubationszeit 72 Stunden.

Versuchs-person	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
1	12,5	4,3	17,3	10,2	14,9
2	61,5	22,8	10,8	44,1	45,4
3	10,2	0,6	1,9	14,2	17,8
4	30,8	4,3	21,5	52,5	61,6
5	14,2	1,0	10,0	20,6	17,7
6	26,6	0,3	12,9	22,9	37,6
7	55,0	0,5	12,4	65,8	70,6
8	19,5	0,4	2,0	16,6	34,3
$\bar{x}$	28,8	4,3	11,1	30,9	37,5
s	19,6	7,4	6,8	20,5	20,8

* Konzentration in M s. S. 9

Tabelle 7:
Stimulationsindices von Lymphozyten. Inkubation mit Chloroquin, nach zwei Stunden Zugabe von PHA. Gesamtinkubationszeit 72 Stunden.

Versuchs-person	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
1	29,9	0,7	12,7	47,3	60,5
2	44,9	0,7	11,3	33,3	36,9
3	41,1	0,9	10,3	48,7	34,8
4	44,5	0,3	40,7	40,9	45,0
5	35,5	0,4	8,6	27,1	29,8
6	44,0	1,2	12,3	87,6	156,4
7	48,5	0,2	60,8	94,9	92,8
8	50,9	0,2	12,9	125,8	134,2
$\bar{x}$	42,4	0,6	21,2	63,2	73,8
s	6,8	0,4	19,1	35,2	48,8

* Konzentration in M s. S. 9

Tabelle 8:
Stimulationsindices von Lymphozyten. Inkubation mit Chloroquin, nach vier Stunden Zugabe von PHA. Gesamtinkubationszeit 72 Stunden.

Versuchs-person	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
1	20,9	0,3	4,3	15,3	14,8
2	30,0	0,3	12,0	23,1	35,1
3	84,9	0,9	10,9	58,8	59,3
4	28,2	0,6	25,2	47,1	22,5
5	44,5	0,3	31,6	50,4	80,1
6	35,5	0,6	28,1	34,8	28,4
7	48,5	0,4	23,2	64,0	109,6
8	44,0	0,5	13,2	56,7	62,4
$\bar{x}$	42,1	0,5	19,3	43,8	51,5
s	19,7	0,2	10,2	17,6	32,4

* Konzentration in M s. S. 9

Tabelle 9:
Stimulationsindices von Lymphozyten. Inkubation mit Chloroquin, nach sechs Stunden Zugabe von PHA. Gesamtinkubationszeit 72 Stunden.

Versuchs-person	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
1	49,6	0,5	29,6	64,8	73,5
2	31,8	0,4	27,3	46,2	40,3
3	44,5	0,9	32,6	41,6	61,9
4	35,5	0,5	26,2	37,8	38,0
5	179,7	0,2	11,7	174,5	197,6
6	48,5	0,4	98,9	75,2	98,9
7	50,9	0,1	6,7	32,6	65,4
8	48,6	0,7	20,9	35,9	34,9
$\bar{x}$	61,1	0,5	31,7	63,6	75,2
s	48,4	0,3	28,6	47,6	35,5

* Konzentration in M s. S. 9

Tabelle 10:
Stimulationsindices von Lymphozyten.
Zusammenfassung der Ergebnisse aller Gruppen (n = 72).
++ bedeutet hochsignifikante ($p < 0,01$) und + bedeutet signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen Lymphozyten, die nur mit PHA bzw. mit PHA/Chloroquin stimuliert wurden.

	PHA	PHA/Chloroquin in mg/100 ml*			
		100	10	1	0,1
$\bar{x}$	37,5	$1,3^{++}$	$20,8^{++}$	44,0	$49,5^{+}$
s	27,4	2,9	16,7	34,2	34,3

* Konzentration in M s. S. 9

4. DISKUSSION

Einfluß von Chloroquin auf immunologische Reaktionen

Die therapeutische Wirksamkeit des Chloroquin bei verschiedenen immunologisch bedingten Erkrankungen, insbesondere beim Erythematodes, erweckte das Interesse zahlreicher Untersucher, wie die große Zahl von Publikationen zu diesem Thema belegt (Übersichten z.B. 18, 19, 29).

Man fand eine Beeinflussung fast aller Funktionen des Immunsystems. Dies wird aus der Tatsache verständlich, daß Chloroquin in allen Zellen grundlegende molekulare Strukturen und biologische Prozesse wie die Nukleinsäuren, RNAse und DNAse oder das Cytochrom-P 450-System beeinflußt. Trotz außerordentlich vielfältiger, zum Teil allerdings auch widerspruchsvoller Befunde läßt sich noch nicht eindeutig das zugrundeliegende therapeutische Prinzip angeben.

Die nachfolgenden Befunde scheinen im wesentlichen die pharmakologischen Wirkungen des Chloroquin auszumachen.

4.1. Einfluß auf die Lysosomen

WEISSMANN (35) wies an Rattenleberlysosomen eine Lysosomenstabilisierung nach (Hemmung der Freisetzung von ß-Glucuronidase und saurer Phosphatase durch verschiedene Noxen). In der Folgezeit wurde dieser Effekt verallgemeinernd als Erklärung für die verschiedensten Phänomene, die nach Chloroquin-Applikation in vivo und in vitro beobachtet wurden, herangezogen. Häufig wurde dabei nicht berücksichtigt, daß die unterschiedliche Ausprägung dieser Effekte in verschiedenen Organen und Spezies nachweisbar ist. Dieser Effekt ist nicht einheitlich, da ZVAIFLER (38) bei Ratten nach Chloroquin-Verfütterung keinen lysosomenstabilisierenden Effekt feststellen konnte. Bei der in vitro-Zugabe des Chloroquin zu isolierten Lysosomen war die Lysosomenmembran nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich stabilisiert.

WILSON (36) beobachtete eine Schutzwirkung durch Chloroquin bei der Infektion von Hühner-Fibroblasten mit dem Newcastle Disease-Virus. Eine Lysosomenstabilisierung war dafür jedoch nicht verantwortlich: die Virusinfektion bedingte einen Anstieg der sauren Phosphatase, ß-Glucuronidase und Ribonuclease als Zeichen einer lysosomalen Schädigung, die durch den Zusatz von Chloroquin nicht beeinflußt wurde.

Das Konzept von der Lysosomenstabilisierung wird jedoch durch die Untersuchungen von FEDORKO et al. (6) und PHILIPPART und KAMENSKY (28) völlig abgelehnt.

In Untersuchungen an Mäusemakrophagen- bzw. Fibroblastenkulturen ließ sich unter Chloroquin eine deutliche Freisetzung lysosomaler Enzyme im Kulturmedium nachweisen. Die elektronenmikroskopischen und histochemischen Untersuchungen von FEDORKO (5) ergaben bei Patienten unter Chloroquin-Therapie eine abnorme Granulabildung in den Vorstufen und den ausgereiften neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und den Lymphozyten. Die Granulabildung wird mit einer Beeinflussung der Lysosomenfunktion erklärt, wobei aber offen bleiben muß, ob es nur eine Schädigung oder eine Zerstörung der Zellorganellen ist.

Die schwache Base Chloroquin wird durch den hohen Gehalt an Säuren in den Lysosomen protonisiert, und dadurch wird es wahrscheinlich unmöglich, die Lysosomenmembran zu passieren. Ob jedoch die immunologische Wirkung des Pharmakon Chloroquin auf der Lysosomenbeeinflussung beruht, ist bisher experimentell nicht bewiesen worden.

4.2. Einfluß des Chloroquin auf die Antikörperbildung und die Antigen-Antikörperreaktion

Eine der wichtigsten Wirkungen des Chloroquin auf immunologische Prozesse scheint die Hemmung der Antigen-Antikörperreaktion zu sein. Dagegen scheint die Antikörperbildung nicht beeinträchtigt zu sein. So konnten

KALMANSON und GUZE (14) keinen Effekt des verwandten Hydroxychloroquin auf die Immunisierung von Meerschweinchen mit Diphtherietoxoid (und BCG) feststellen. Ähnliche Ergebnisse erzielten NEBLETT et al. (21): Chloroquin beeinflußte nicht die Bildung von Hämolysinen bei der Immunisierung von Kaninchen mit Schaferythrozyten. Wenn man Chloroquin nach der erfolgten Immunisierung zuführte, so konnten die Antikörper-Spiegel nicht gesenkt werden. Dagegen hatte Chloroquin keinen Hemmeffekt auf die komplementunabhängige Antigen-Antikörperreaktion. Im Gegensatz dazu hatte es eine stark hemmende Wirkung auf die komplementabhängige Immunhämolyse, so daß die Autoren (21) als Haupteffekt bei Bindegewebserkrankungen die negative Beeinflussung der Komplementaktivierung postulieren. In einem geringeren Ausmaß wird auch eine Beeinflussung der komplementunabhängigen Antigen-Antikörperreaktion angenommen.

SZILAGYI und KAVAI (32) wiesen ebenfalls eine Hemmung der Antigen-Antikörperreaktion in vivo und in vitro nach, wobei als experimentelles Modell die Ovalbumin-Sensibilisierung der Meerschweinchen diente. Eine geringere Dissoziation bereits gebildeter Immunpräzipitate ließ sich unter Chloroquin nachweisen. Eine letale anaphylaktische Reaktion läßt sich durch Chloroquin allerdings nicht verhindern. Bei nicht letal verlaufenden anaphylaktischen Reaktionen wird die Symptomatik abgeschwächt, und die durch die Antigen-Antikörperkomplexe verursachte Hauptreaktion blockiert. Die unter therapeutischen Bedingungen nachweisbaren Plasma-

konzentrationen in vivo sind jedoch niedriger, als die erforderlichen Chloroquin-Dosen in vitro.

Im Hinblick auf die Wirkung des Chloroquin beim Erythematodes sind die bereits 1963 von STOLLAR und LEVINE (31) erhobenen Befunde von besonderer Bedeutung. Die Zugabe von Chloroquin zu LE-Seren vermindert die Bindung von denaturierter DNS, was sich mit Hilfe der Messung der Komplementfixation bestimmen ließ. Die Ursache dafür ist in der Bindung des Chloroquin an die DNS zu suchen. Die Antikörper und das Komplement, sowie deren Funktion wurden nicht beeinflußt (31).

Sehr ausführliche Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Chloroquin bei Antigen-Antikörperreaktionen wurden von HOLTZ et al. (12) durchgeführt. Chloroquin hemmte in Konzentrationen von 0,5 - 1,0 mg/ml die durch die ANA- oder DNS-Antikörper ausgelösten LE-Zellphänomene. In höheren Konzentrationen wurde die Immunhämolyse inhibiert und zwar: inkomplette anti-D, E, C, c, e, Duffy, Kidd, komplette D,E,C-Antikörper sowie die A- und B-Hämolysine und Erythrozyten-Autoantikörper. Bei Konzentrationen von 10 - 15 mg/ml wurden die Reaktionen mit inkompletten anti-D, E, c, e bzw. Kell, P-Antikörper, Kälteagglutinine, Rheumafaktoren, Thrombozyten-Isoantikörper, ANA der (NZB/NZW) F_1-Mäuse gehemmt.
Nicht beeinflußt wurden die Reaktionen mit anti-A, anti-B, anti-Humanglobulin von Kaninchen und Ziegen, Thyreoglobulin-Autoantikörper, heterologe M- und N-Antikörper, Australia-Antigen-Antikörper, Erythro-

zyten-Autoantikörper der NZB-Mäuse und die Agglutination durch PHA (12).

Unter dem Einfluß von Chloroquin dissoziierten auch bereits gebildete Immunkomplexe wieder, und die ANA wurden von den Leberkernen abgespalten. Nach der Entfernung des Chloroquin aus dem Reaktionsgemisch läßt sich die Antigen-Antikörperreaktion erneut nachweisen: Chloroquin veränderte also nicht irreversibel die Struktur der Reaktionspartner. Es bindet sich nicht irreversibel an die Immunglobuline oder an die Membranantigene der Erythrozyten. Aufgrund der Untersuchungen der elektrophoretischen Mobilität der Erythrozyten nehmen die Autoren an, daß die reversible Veränderung der Ladungen mancher Antigene unter Chloroquin die Reaktion mit bestimmten Antikörpern verhindert. Die für die in vitro beobachteten Effekte erforderlichen Chloroquin-Konzentrationen können allerdings in vivo nicht angewendet werden. Dies trifft jedoch nur bei Berücksichtigung der Plasmaspiegel zum Vergleich zu. Die 100- bis 1.000fache Anreicherung des Chloroquin in bestimmten Geweben und Organellen könnte jedoch zu analogen Konzentrationen wie in den oben zitierten in vitro-Versuchen führen. Ob die Hemmung der ANA-Reaktion mit der DNS für die Wirksamkeit des Chloroquin beim LE maßgeblich ist, scheint noch umstritten. Ebenso ist es zweifelhaft, ob die Beeinflussung der ANA-DNS-Reaktion in vitro für die Beurteilung der Wirksamkeit der ChloroquinTherapie in vivo herangezogen werden kann. Vielleicht hat jedoch die Dissoziation der Immunkomplexe durch Chloro-

quin eine wesentlich größere Bedeutung bei der Therapie des LE, da der Erythematodes heute als Musterbeispiel einer Immunkomplexkrankheit gilt. SAMS (29) nimmt an, daß die Bindung des Chloroquin an die DNS die Struktur der Helix beeinflußt und damit die antigenen Eigenschaften des Moleküls ändert.

4.3. Beeinflussung zellulärer Immunphänomene

Chloroquin kann die Effektorzellen im Rahmen der Abläufe der zellgebundenen Immunität beeinflussen.

HURVITZ und HIRSCHHORN (13) fanden bei einer Chloroquin-Konzentration von 10^{-2} mg/ml eine Hemmung der Lymphozytentransformation durch PHA gemessen mit Hilfe der Bestimmung des Mitoseindex. PANAYI et al. (25) fanden ebenfalls eine verminderte PHA-Transformation von Lymphozyten bei Patienten, die 1 - 10 Jahre mit Chloroquin wegen rheumatoider Arthritis behandelt wurden. Die Patienten erhielten allerdings auch Acetylsalicylsäure (Aspirin), das ebenfalls eine Hemmung des LTT bewirkt, so daß die Aussagekraft dieser Untersuchung eingeschränkt wird. FORSDYKE (8) untersuchte den Einfluß verschiedener Konzentrationen von PHA, Chloroquin und bei Vorhandensein und Fehlen von Komplement auf den LTT. Aufgrund seiner Untersuchungen nimmt FORSDYKE (8) an, daß Chloroquin bei Autoimmunkrankheiten und Malaria über einen komplementähnlichen Effekt wirkt. Dies wird aufgrund von Analogieschlüssen angenommen.

BUTTERWORTH (2) wies eine Hemmung der unspezifischen Zytotoxizität PPD-stimulierter Lymphozyten unter Zugabe von Chloroquin nach. PETER (27) stellte die Aufhebung zytotoxischer und zytolytischer Eigenschaften der Überstände von Lymphozytenkulturen bei Anwesenheit von Chloroquin fest. Dieser Effekt wurde auch mit Steroiden, nicht jedoch mit den nicht steroidalen anti-inflammatorischen Substanzen wie Acetylsalicylsäure, Indomethazin oder Phenylbutazon erreicht. Da die komplementabhängige, antikörperbedingte Zytolyse durch Chloroquin und Steroide nicht verhindert wurde, wird von PETER (27) eine unspezifische Membranschutzwirkung als Grundlage der Cytotoxin-Neutralisation abgelehnt.

WARD (34) stellte eine Hemmung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten auf die chemotaktischen Faktoren (fünfte und sechste Komplementkomponente) durch niedrige Chloroquin-Konzentrationen fest. In wesentlich höheren Konzentrationen inhibiert Chloroquin auch die Komplementwirkung (komplementabhängige Schaferythrozytenlysis). Bei der umgekehrten passiven Arthus-Reaktion (intravenöse Verabreichung des Antigens, intracutane Injektion des entsprechenden Antikörpers) beim Meerschweinchen als einem in vivo-Modell zur Messung der Chemotaxis kam es unter hohen Dosen Chloroquin zur Verhinderung der Vaskulitis.

Dabei waren das zirkulierende Antigen und Komplement in den Gefäßen fixiert, während das Serumkomplement nicht beeinflußt war. Im Gegensatz zu den Kontrollen kam es jedoch nicht zum Einströmen der neutrophilen

Granulozyten in das Reaktionsgebiet, woraus auf die Hemmung der C-abhängigen Chemotaxis-Stimulation geschlossen wird.
In hohen Konzentrationen wird durch Chloroquin die Phagozytose von Zymosanpartikeln durch Kaninchengranulozyten aufgehoben. Aus diesen Experimenten zog WARD (34) den Schluß, daß die anti-inflammatorische Wirkung des Chloroquin in niedrigen Konzentrationen (0,5 - 1,0 mg/ml) vornehmlich durch die Hemmung der C-abhängigen Chemotaxis zustande kommt. Bei höheren, in vivo wahrscheinlich nicht zu erreichenden Konzentrationen, kommt es zur Beeinflussung des Komplementsystems und der Phagozytose. Die Hemmung der Chemotaxis wird durch einen direkten Einfluß auf die neutrophilen Granulozyten bewirkt. GAUDERER und GLEICH (9) erzielten an eosinophilen Granulozyten eine ähnliche Hemmung der Chemotaxis, allerdings bei relativ hohen Konzentrationen (10 - 15 mg/ml). Auch sie nehmen eine direkte Wirkung des Chloroquin auf die eosinophilen Granulozyten an.
BAJDEKOFF et al. (1) stellte unter Chloroquin-Gabe eine Vermehrung der Basophilen (Mastzellen?) in der Haut von Ratten fest. Als Ursache vermuten sie die Aktivierung der Histidindecarboxylase und einen Anstieg des Histamingehaltes. Die Relevanz dieser Befunde ist nicht klar.

4.4. Einfluß des Chloroquin auf Nukleinsäuren und Chromosomen

Die in der Folge beschriebenen Effekte können teilweise zur Erklärung der oben beschriebenen Phänomene dienen.

Bereits 1952 beobachteten PARKER und IRVIN (26) eine Interaktion von Nukleinsäuren und Nukleoproteinen mit Chloroquin. COHEN und YIELDING (3) stellten 1965 eine vollständige Inhibition der DNS-abhängigen DNS-Polymerase, in einem geringeren Ausmaß auch der RNS-Polymerase fest. Diese kompetitive Hemmung der Enzyme beruht auf einer Komplexbildung zwischen Chloroquin und dem "DNS-Primer". Außerdem wiesen FIELD et al. (7) eine Hemmung des Einbaus von markiertem Thymidin in die DNS der Rattenleber, Niere und Milz nach, wenn Chloroquin gleichzeitig mit der Purinbase verabreicht wurde. Auch der Einbau von Uridin und Adenin in verschiedene RNS-Fraktionen der Ratten- und Mausleber war eingeschränkt, nicht dagegen die Inkorporation von Orotsäure, die ein Indikator der de novo-Pyrimidinsynthese ist. Es muß somit eine Wirkung über die Purinbasen der DNS und RNS angenommen werden. Weiterhin konnten die Autoren (7) eine Beeinflussung der Energieproduktion der Zelle ausschließen, denn andere energieverbrauchende Prozesse, wie der Einbau von markiertem Leucin in die Proteine der Ratten- und Mausleber, liefen ungestört ab. Da auch die Aufnahme der markierten Vorstufen Thymidin und Uridin in die Gewebe nicht behindert war, entfällt eine Störung im Transport-

mechanismus, und es muß als Ursache der Inhibition des Baseneinbaus in die Nukleinsäuren die Hemmung der DNS- und RNS-Polymerase angenommen werden.

Der Vollständigkeit halber sei auf einige Wirkungen des Chloroquin an den Chromosomen bzw. auf die Zellteilung hingewiesen. GAUDIN et al. (10) sahen unter Chloroquin eine Hemmung der Tymidin-Aufnahme in UV-stimulierte Lymphozyten, deren DNS-Synthese durch Hydrourea blockiert worden war. Aus diesem Befund wird auf eine Inhibition des DNS-repairs durch das Chloroquin geschlossen.

YIELDING et al. (37) stellten eine coteratogene Wirkung des Chloroquin fest: Chloroquin allein führte in der verwendeten Dosierung nicht zu Mißbildungen, während in Kombination mit Röntgenstrahlen erhöhte Schäden an Mäuseembryonen nachweisbar waren. Allerdings wird auch der Effekt ionisierender Strahlen auf somatische Zellen durch Chloroquin gesteigert (radiomimetische Chloroquin-Wirkung (19)). Als Erklärung für die chloroquinbedingte Steigerung der Strahlenschäden wird die Möglichkeit einer DNS-repair-Hemmung diskutiert.

NEILL et al. (22) stellten bei Patienten, die wegen rheumatoider Arthritis jahrelang mit Chloroquin (und Aspirin) behandelt worden waren, in der PHA-stimulierten Lymphozytenkultur eine erhöhte Inzidenz von Chromosomenanomalien fest. Wenngleich diese Veränderungen nur eine geringe Bedeutung (instabile Ano-

malien) haben, weisen sie doch auch auf eine unabhängig vom Repair-Mechanismus ablaufende Beeinflussung der Zellteilung unter Chloroquin hin.

4.5. Weitere Befunde

In den letzten Jahren ist aufgrund immunologischer, elektronenoptischer und tierexperimenteller Befunde die Virusgenese des Erythematodes diskutiert worden (4). Aus diesem Grund erscheinen die Befunde von SEGHAL et al. (30) besonders bemerkenswert: Chloroquin erhöhte die poly I:C-induzierte Interferonproduktion in humanen Fibroblasten um das 4- bis 16fache. Dieser Effekt könnte auf der RNS-Synthese-Hemmung durch das Chloroquin beruhen. Durch die Blockade einer Repressor-RNS könnte es zur Steigerung der Interferonproduktion kommen.

Eine weitere Möglichkeit eines biologischen bzw. biochemischen Effektes unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen könnte auf einer Wechselwirkung mit Prostaglandinen (20) beruhen. Diese Mediatorsubstanz und ihre diversen Metaboliten spielen bei zahlreichen, im einzelnen noch nicht bekannten biochemischen Prozessen intra- und extrazellulär eine Rolle. Chloroquin hat konzentrationsabhängig eine antagonistische bzw. agonistische Wirkung gegenüber PGE_2 (in geringerem Maße werden auch andere Prostaglandine beeinflußt).

4.6. Diskussion der eigenen Befunde

Wir untersuchten den Einfluß des Chloroquin in verschiedenen Konzentrationen auf die PHA-induzierte Stimulation der Lymphozyten, der mit Hilfe der ^{3}H-Thymidin-Einbaurate in die DNS gemessen und als Stimulationsindex ausgedrückt wurde.
Zusätzlich wurde Chloroquin in unterschiedlichen Zeitintervallen vor oder nach PHA zur Lymphozytenkultur zugegeben, was jedoch ohne Einfluß war. Die Stimulationsindices unterschieden sich nicht wesentlich, wenn PHA und Chloroquin gleichzeitig, wenn PHA 2, 4 und 6 Stunden nach dem Chloroquin oder umgekehrt Chloroquin 2, 4, 6, 9 und 12 Stunden nach der PHA-Zugabe dem Inkubationsansatz zugesetzt wurde.

Im Gegensatz zu der fehlenden zeitlichen Abhängigkeit hatten die verwendeten Konzentrationen des Chloroquin auf die PHA-induzierte Lymphozytenstimulation eine maßgebliche Wirkung. Chloroquin in einer Konzentration von 100 mg/100 ml (= 3,135 M) übte auf die Lymphozyten einen toxischen Effekt aus, der sich im Abfall des Stimulationsindex unter 1 zeigte.
Dieser Effekt war konstant und für alle Gruppen signifikant (Student t-Test). Geringere Konzentrationen von 10 mg/100 ml (= 0,313 M) führten immer noch zu eindem deutlichen Abfall der Stimulationsindices. Bei einer Konzentration von 1 mg/100 ml (= 0,013 M) ließ sich ein Effekt auf die PHA-induzierte Lymphozytentransformation nicht nachweisen. Überraschenderweise

kam es bei der niedrigsten Konzentration von 0,1 mg/ 100 ml (= 0,003 M) aber zu einer deutlichen Steigerung des Stimulationsindex, also zu einer Steigerung der PHA-Wirkung. Die Ergebnisse in den einzelnen Gruppen, die durch die zeitlichen Intervalle zwischen der Zugabe der beiden Substanzen definiert waren, ergaben in der statistischen Berechnung keine signifikanten Unterschiede trotz eines klar erkennbaren Trends, wie er oben dargelegt wurde. Dies ist einerseits durch die methodenbedingte große Streuung (ausgedrückt als Standardabweichung s), andererseits durch die relativ kleinen Gruppen von jeweils acht Probanden bedingt. Da - wie bereits ausgeführt - die zeitlich versetzte Zugabe von Chloroquin keinen Einfluß auf die PHA-Stimulation in den einzelnen Gruppen hatte, faßten wir diese für die einzelnen Konzentrationen zusammen.

Dadurch ergaben sich für jede der Konzentrationen größere Gruppen, und die bereits festgestellten Unterschiede ließen sich jetzt auch als signifikant ($p < 0,01$) sichern.
Es ergeben sich somit folgende Resultate:

> Bei einer Konzentration von 100 mg/100 ml (= 3,135 M) hochsignifikanter ($p < 0,01$) Abfall der PHA-induzierten Stimulation unter 1.

Bei einer Konzentration von 10 mg/100 ml (= 0,313 M) hochsignifikanter ($p < 0,01$) Abfall der PHA-induzierten Stimulation auf fast die Hälfte unbehandelter Lymphozyten.

Bei einer Konzentration von 1 mg/100 ml (= 0,031 M) ein leichter, statistisch jedoch nicht signifikanter Anstieg des Stimulationsindex.

Bei einer Konzentration von 0,1 mg/100 ml (= 0,003 M) ein statistisch signifikanter Anstieg des Stimulationsindex im Vergleich zu PHA-behandelten Kontrollen ($p < 0,05$).

Zusammenfassend fand sich also bei der hier gewählten Versuchsanordnung folgendes Ergebnis:

1. Der Effekt des Chloroquin auf die PHA-induzierte Lymphozytenstimulation ist unabhängig vom zeitlichen Intervall zwischen der PHA- und Chloroquin-Zugabe zum Inkubationsansatz (zumindest bei den hier gewählten zeitlichen Intervallen).

2. Chloroquin übt einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die PHA-induzierte Lymphozytenstimulation aus:

- bei hohen Konzentrationen toxische Schädigungen der Lymphozyten,
- bei mittleren Konzentrationen eine Hemmung der Stimulation,
- bei niedrigen Konzentrationen eine Verstärkung des PHA-Effektes.

Wie bereits ausführlich dargestellt, wurden bisher die Lysosomenfunktion und die humorale Seite der Immunreaktion unter Chloroquin-Einwirkung intensiv untersucht, während kaum Befunde über die zelluläre Immunreaktion, die mit der PHA-induzierten Lymphozytentransformation meßbar ist, vorliegen.

Die hier vorliegenden Ergebnisse stehen zum Teil in Widerspruch zu den Befunden von HURVITZ und HIRSCHHORN (13), die den Einfluß von Chloroquin auf die PHA-induzierte Lymphozytenstimulation mit Hilfe der Bestimmung des Mitoseindex untersuchten. HURVITZ und HIRSCHHORN (13) fanden eine zeitliche Abhängigkeit zwischen der Chloroquin- und PHA-Zugabe, und außerdem fanden sie keine Steigerung des Stimulationsindex bei niedrigen Chloroquin-Konzentrationen. Diese Widersprüche lassen sich teilweise dadurch erklären, daß die Autoren nicht so niedrige Konzentrationen untersucht haben.

Auch BUTTERWORTH (2) fand lediglich eine Hemmung der Lymphozytenfunktion. Allerdings untersuchte er die unspezifische Zytotoxizität und den Thymidineinbau von PPD-stimulierten Lymphozyten und verwendete höhere Chloroquin-Konzentrationen.

Wie lassen sich unsere Ergebnisse erklären?

Die toxische Wirkung von Chloroquin in der höchsten von uns verwendeten Konzentration und die deutliche Hemmung des Thymidineinbaus in der niedrigen Konzentration von 10 mg/100 ml (= 0,313 M) lassen sich zwanglos aus der Einwirkung des Chloroquin auf den Metabolismus der Nukleinsäuren, wie er ausführlich dargelegt wurde, erklären.

Die Erklärung des potenzierenden Effektes von Chloroquin in der niedrigsten Dosierung von 0,1 mg/100 ml (= 0,003 M) auf PHA-induzierte Stimulation stößt auf größere Schwierigkeiten. Im Augenblick ergeben sich für diese Befunde zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1. Beeinflussung verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen

   Es ist vorstellbar, daß verschiedene Lymphozyten-Subpopulationen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Chloroquin-Wirkung haben. Im Falle einer stärkeren Empfindlichkeit der T-Suppressor-Zellen im Vergleich zu den T-Helfer-Zellen würde daraus eine verminderte Hemmung der Lymphozyten, also eine stärkere Stimulation resultieren. Für diese Hypothese gibt es vorläufig noch keine experimentellen Beweise.

2. Wechselwirkung mit Prostaglandinen

MANKU und HORROBIN (20) fanden, daß Chloroquin ein Antagonist der Prostaglandine ist, jedoch im Gegensatz zu Acetylsalicylsäure und vergleichbaren Medikamenten kein Hemmer der Cyclooxygenase ist, sondern wenigstens zum Teil ein kompetitiver Antagonist. Der Einfluß von Chloroquin auf die Prostaglandine war am stärksten am PGE_2 nachweisbar. In bestimmten Konzentrationen wirkte Chloroquin wie ein PGE_2-Agonist. PGE_2 seinerseits hemmte die Lymphozytenfunktion über eine Steigerung des zellulären cAMP-Gehaltes (11). Wenn nun Chloroquin sich konzentrationsabhängig wie ein PG-Agonist bzw. PG-Antagonist verhält, käme es zu einer PGE_2-vermittelten Steigerung bzw. Hemmung der Lymphozytenfunktion, was das unterschiedliche Verhalten der SI im LTT bei den Chloroquin-Konzentrationen 10 mg/100 ml (= 0,313 M) bzw. 0,1 mg/100 ml (= 0,003 M) bei gleichzeitiger PHA-Gabe erklären könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Wir untersuchten den Einfluß verschiedener Konzentrationen von Chloroquin auf die PHA-induzierte Lymphozytentransformation mit Hilfe der Messung des Einbaus von ^{3}H-Thymidin in die DNS (Lymphozytentransformationstest = LTT). Außerdem sollte festgestellt werden, ob eine Beeinflussung zeitabhängig ist, weshalb Chloroquin in unterschiedlichen Intervallen vor und nach PHA zugegeben wurde. Dabei ergaben sich folgende Befunde:

1. Der Chloroquin-Effekt auf die PHA-induzierte Lymphozytentransformation war in der gewählten Versuchsanordnung unabhängig vom zeitlichen Intervall zwischen der PHA- und Chloroquin-Zugabe zum Inkubationsansatz.

2. Chloroquin übt einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die PHA-induzierte Lymphozytentransformation aus:

   Bei der Konzentration von 100 mg/100 ml (≈ 3,135 M) hochsignifikanter ($p < 0,01$) Abfall der PHA-induzierten Stimulation unter einen SI von 1.

Bei der Konzentration von 10 mg/100 ml (= 0,313 M) hochsignifikanter ($p < 0,01$) Abfall der PHA-induzierten Stimulation auf fast die Hälfte unbehandelter Lymphozyten (Kontrolle 37,5 - Chloroquin 20,8).

Bei der Konzentration 1 mg/100 ml (= 0,031 M) ein leichter, statistisch jedoch nicht signifikanter Anstieg des Stimulationsindex (Kontrolle 37,5 - Chloroquin 44,0).

Bei der Konzentration 0,1 mg/100 ml (= 0,003 M) ein statistisch signifikanter Anstieg des Stimulationsindex im Vergleich zu PHA-behandelten Kontrollen ($p < 0,05$) (Kontrolle 37,5 - Chloroquin 49,5).

Diese Ergebnisse wurden im Lichte der bisher aus der Literatur bekannten immunologischen Wirkungen des Chloroquin diskutiert. Mögliche biochemische Hypothesen zum Wirkungsmechanismus der Substanz auf die Lymphozyten wurden erörtert. Außer einer unterschiedlichen Beeinflussung der verschiedenen Lymphozyten (T-Helfer- bzw. T-Suppressor-Zellen) wird eine dosisabhängige Stimulation oder Hemmung der Prostaglandine (besonders PGE_2) diskutiert.

6. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ANA	= Antinukleäre Antikörper
cAMP	= cyclisches Adenosylmonophosphat
DNAse	= Desoxyribonuklease
DNS	= Desoxyribonukleinsäure (= DNA)
LE	= Lupus erythematodes
LTT	= Lymphozytentransformationstest
n	= Anzahl
NZB	= New Zealand Brown-Mäuse
NZW	= New Zealand White-Mäuse
PG	= Prostaglandine
PHA	= Phytohämagglutinin
PPD	= purified protein derivative
RNAse	= Ribonuklease
RNS	= Ribonukleinsäure (= RNA)
s	= Standardabweichung des Mittelwertes
SI	= Stimulationsindex
$\bar{x}$	= Mittelwert

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. RAJDEKOFF, B., BOJKOV, B., DURMISCHEV, A.:
Der Einfluß von Resochin auf die Gewebsbasophilen in der Rattenhaut.
Allerg. Immunol. 23: 310-312 (1977)

2. BUTTERWORTH, A.E.:
Non-specific cytotoxic effect of antigen -transformed lymphocytes.
Cell. Immunol. 16: 60-73 (1975)

3. COHEN, S.N., XIELDING, K.L.:
Inhibition of DNA and RNA polymerase reactions by chloroquine.
Proc. Natl. Acad. Sci. 54: 521-527 (1965)

4. DUBOIS, L.:
Lupus erythematosus.
Univ. Southern California Press 35: 76-78 (1976)

5. FEDORKO, M.E.:
Effect of chloroquine on morphology of cytoplasmic granules in maturing human leukocytes - an ultrastructural study.
J. Clin. Invest. 46: 1932-1942 (1967)

6. FEDORKO, M.E., HIRSCH, J.G., COHN, Z.A.:
Autophagic vacuoles produced in vitro. I. Studies on cultured macrophages exposed to chloroquine.
J. Cell Biol. 38: 377 (1968)

7. FIELD, R.C., GIBSON, B.R., HOLBROOK jr., D.J., McCALL, B.M.:
Inhibition of precursor incorporation into nucleic acid of mammalian tissues by antimalarial aminoquinolines.
Br. J. Pharmacol. 62: 159-164 (1978)

8. FORSDYKE, D.R.:
Evidence for a relationship between chloroquine and complement from studies with lymphocyte mitogens: Possible implications for the mechanism.
Can. J. Microbiol. 21: 1581-1586 (1975)

9. GAUDERER, C.A., GLEICH, G.J.:
Inhibition of eosinophilotaxis by chloroquine and corticosteroids.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 157: 129-133 (1978)

10. GAUDIN, D., GREGG, R.S., YIELDING, K.L.:
Inhibition of DNA repair replication by DNA binding drugs which sensitize cells to alkylating agents and X-rays.
Proc. Soc. Ex. Biol. Med. 141: 543-547 (1972)

11. GOODWIN, J.S., MESSNER, R.P., PEAKE, G.T.:
Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro. Changes with mitogen dose and preincubation.
J. Clin. Invest. 62: 753-760 (1978)

12. HOLTZ, G., MANTEL, W., BUCK, W.:
The inhibition of antigen-antibody reactions by chloroquine and its mechanism of action.
Z. Immunitätsforsch. Immunobiol. 146: 145-157 (1973)

13. HURVITZ, D., HIRSCHHORN, K.:
Suppression of in vitro lymphocyte response by chloroquine.
New Engl. J. Med. 273: 23-26 (1965)

14. KALMANSON, G.M., GUZE, L.B.:
Studies of the effects of hydroxychloroquine on immune response.
J. Lab. Clin. Med. 65: 484-489 (1965)

15. LAMVIK, O.J.:
Separation of lymphocytes from human blood.
Acta Haematol. 35: 294-304 (1966)

16. LEVENTHAL, B.G., OPPENHEIM, J.J., HERSH, E.M.:
The transformation of column-purified lymphocytes with nonspecific and specific antigenic stimuli.
J. Immunol. 101: 262-267 (1968)

17. LING, N.R., KAY, J.E.:
Lymphocyte stimulation.
2nd Ed.
North Holland Publ. Co., Amsterdam-Oxford 1975, pp. 123-152

18. MACKENZIE, A.H.:
An appraisal of chloroquine.
Arthritis Rheum. 13: 280-291 (1970)

19. MALINA, L., BIELICKY, T.:
Gegenwärtige Kenntnise über den Wirkungsmechanismus der Antimalariamittel.
Hautarzt 19: 385-388 (1968)

20. MANKU, M.S., HORROBIN, D.F.:
Chloroquine, quinine, procaine, quinidine and clomipramine are prostaglandin agonists and antagonists.
Prostaglandins 12: 789-801 (1976)

21. NEBLETT, T.R., BURNHAM, T.K., KAY, N.:
Chloroquine: Its mechanism of action upon immune phenomena.
Arch. Dermatol. 92: 720-725 (1965)

22. NEILL, W.A., PANAYI, G.S., DUTHIE, J.J.R., PRESCOTT, R.J.:
Action of chloroquine phosphate in rheumatoid arthritis.
II. Chromsome damaging effect.
Ann. Rheum. Dis. 32: 547-550 (1973)

23. NOWELL, P.C.:
Phytohemagglutinin an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes.
Cancer Res. 20: 462-466 (1960)

24. OPPENHEIM, J.J., SCHECTER, B.:
Lymphocyte transformation.
in: Manual of clinical immunology, Washington DC, 1976, pp. 81-94

25. PANAYI, G.S., NEILL, W.A., DUTHIE, J.J.R., McCORMICK, J.N.:
Action of chloroquine phosphate in rheumatoid arthritis.
Ann. Rheum. Dis. 32: 316-318 (1973)

26. PARKER, F.S., IRVIN, J.L.:
The interaction of chloroquine with nucleic acids and nucleoproteins.
J. Biol. Chem. 199: 897-909 (1952)

27. PETER, J.B.:
Cytotoxin(s) produced by human lymphocytes: Inhibition by anti-inflammatory steroids and antimalarial drugs.
Cell. Immunol. 2: 199-202 (1971)

28. PHILIPPART, M., KAMENSKY, E.:
Chemical induction of lysosomal storage.
Adv. Exp. Med. Biol. 68: 473-493 (1976)

29. SAMS, W.M.:
Chloroquine: Mechanism of action.
Mayo Clin. Proc. 42: 300-309 (1967)

30. SEGHAL, P.B., TAMM, I., VILCEK, J.:
Enhancement of human interferon production by neutral red and chloroquine: Analysis of inhibition of protein degradation and macromolecular synthesis.
J. Exp. Med. 142: 1283-1300 (1975)

31. STOLLAR, D., LEVINE, L.:
Antibodies to denaturated desoxyribonucleic acid in Lupus Erythematosus serum.
V. Mechanism of DNA-anti-DNA inhibition by chloroquine.
Arch. Biochem. Biophys. 101: 335-341 (1963)

32. SZILAGYI, T., KAVAI, M.:
The effect of chloroquine on the antigen -antibody reaction.
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 38: 411-417 (1970)

33. VLASZIN, Z., NETH, R., SCHMIDTKE, H., BECKMANN, H., HELLER, G.:
Mikrochemischer Nachweis des LTT.
Klin. Wschr. 48: 56 (1970)

34. WARD, P.A.:
The chemosuppression of chemotaxis.
J. Exp. Med. 124: 209-226 (1966)

35. WEISSMANN, G.:
Labilization and stabilization of lysosomes.
Fed. Proc. 23: 1038-1044 (1964)

36. WILSON, D.E.:
Chloroquine: Protection against virus-induced cell damage without inhibition of virus growth.
J. Gen. Virol. 14: 107-109 (1972)

37. YIELDING, L.W., RILEY, T.L., YIELDING, K.L.:
Preliminary study of caffeine and chloroquine enhancement of X-ray induced bith defects.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68: 1356-1361 (1976)

38. ZVAIFLER, N.J.:
The subcellular localization of chloroquine and its effects on lysosomal disruption.
Arthritis Rheum. 7: 760 (1964)

DANKSAGUNG

Bei Herrn Professor Dr. Dr. A. GREITHER möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Klinik ausführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. G. GOERZ für die Überlassung des Themas und die freundliche Hilfe bei der Abfassung der Arbeit.

Herr Dr. T. RUZICKA danke ich für die zahlreichen Anregungen und die hilfsbereite Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit.

Weiter gilt mein Dank Fräulein W. KONRAD für die sorgfältige technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche.

LEBENSLAUF

Am 4.12.1952 wurde ich in Cochem an der Mosel als erstes von drei Geschwistern geboren.

Meine Eltern sind der Lehrer Karl Loosen und seine Ehefrau Hildegard geb. Fuchs.

1959 wurde ich in die damalige Katholische Volksschule Karden eingeschult. 1964 trat ich in das Neusprachliche Martin von Cochem-Gymnasium ein, das ich am 15.5.1972 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Universität Düsseldorf. Am 21.12.1977 erhielt ich die Approbation als Zahnarzt.

Seit dem 1.1.1978 arbeite ich als Assistent an der Westdeutschen Kieferklinik, Düsseldorf.